

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1964 . N° 509

**ETUDE COMPAREE DES METHODES
D'EXTRACTION DE LA MORPHINE,
UTILISEES EN TOXICOLOGIE,**

T H È S E

pour le Doctorat de l'Université de Lyon, Section de Pharmacie
présentée et soutenue publiquement
devant LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

le 1er Juillet 1964

par

Mohamed Fouad FADEL

Certificat d'Etudes Spéciales de Parasitologie
Certificat d'Etudes Supérieures de Pharmacie Industrielle

né le 30 Décembre 1932

à Alep (Syrie)

1964

F. ANDRE

5 rue Bugeaud Lyon

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1964 . N° 509

**ETUDE COMPAREE DES METHODES
D'EXTRACTION DE LA MORPHINE,
UTILISEES EN TOXICOLOGIE,**

T H È S E

pour le Doctorat de l'Université de Lyon, Section de Pharmacie
présentée et soutenue publiquement
devant LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

le 1^{er} Juillet 1964

par

Mohamed Fouad FADEL

Certificat d'Etudes Spéciales de Parasitologie
Certificat d'Etudes Supérieures de Pharmacie Industrielle

né le 30 Décembre 1932

à Alep (Syrie)

1964

F. ANDRE

5 rue Bugeaud Lyon

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens Honoraires

M. J. LEPINE

Membre de l'Institut

M. H. HERMANN

Correspondant de l'Institut

Doyen : M. J.-F. CIER

Assesseurs : MM. M. LEVRAT

L. REVOL

Professeurs Honoraires

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND
MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY,
DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET.

Professeurs

MM. CIBERT	Clinique urologique
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et d'hygiène mentale
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio- vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique
POLLOSSON	Clinique gynécologique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie

MM. COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligra- phie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-ptisiologie
CREYSSEL	Chaire de clinique chirurgicale orthopédique et traumatologie
DARGENT	Clinique carcinologique
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Thérapeutique
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge
GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales
CHATONNET	Physiologie B
GUINET	Clinique endocrinologique
TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
FREIDEL	Clinique stomatologique
MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique
DUMONT Louis	Histologie et embryologie
PERROT	Chimie
CIER J.-F.	Physiologie A
PERRIN Jean	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
MICHAUD Pierre	Clinique de chirurgie cardiaque
X...	Biologie médicale et pharmacodynamie
X...	Clinique des maladies infectieuses

Professeurs à titre personnel

MM. BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
------------	---

MM. BERTOYE	Bactériologie
MANSUY	Neuro-Chirurgie
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique
SARROUY	Clinique de pédiatrie
LACROIX	Hygiène et clinique des maladies des pays chauds
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique
LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL	Médecine générale
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
CIER André	Pharmacie chimique et Pharmacologie

Professeurs sans chaire

MM. ROMAN	Parasitologie
FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique biologique

Maîtres de Conférences agrégés titulaires

MM. CREYSSEL Roger	Chimie biologique
THIVOLET	Hygiène
GARIN	Parasitologie
PINET	Electro-radiologie
ODDOUX	Botanique et cryptogamie
de SOLLIERS	Chimie analytique
TOLOT	Médecine du travail
DESPIERRES	Médecine générale
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
DESCOTES	Chirurgie générale
JOUVET	Pathologie expérimentale
PEYRIN	Physique biologique
TOMMASI	Anatomie pathologique
BUFFARD	Electro-radiologie
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
de MOURGUES F.	Stomatologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
REBOUILLAT	Chirurgie générale
ROMAGNY	Pédiatrie
DELAHAYE J.P.	Médecine générale
DELEUZE	Anesthésiologie
GIRAUD	Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique
MICHEL	Anesthésiologie
FRANCOIS	Pédiatrie et puériculture
MICHOULIER	Chirurgie générale

MM. COLOMB	Dermatologie
LAMBERT	Médecine générale
FRIES	Médecine générale
GILLY	Pédiatrie
ROBERT	Médecine générale
BOUCHET	Anatomie

Maîtres de Conférences agrégés stagiaires

MM. DUROUX	Anatomie
BRETTE	Thérapeutique
FAVRE-GILLY	Hématologie
GIROD	Histologie et embryologie
GRAS	Chimie biologique
MALLEIN	Chimie analytique
RIFFAT	Hygiène
FAUCON	Biologie médicale et pharmacodynamie
FLANDROIS	Physiologie
VIALLIER-RAYNAUD	Bactériologie

Agrégés en exercice

MM. BURTHIAULT	Obstétrique
GIGNOUX	Oto-rhino-laryngologie
GUILLEMIN	Chirurgie générale
JAUBERT de BEAUJEU	Chirurgie générale
MARION Pierre	Chirurgie générale
PLAUCHU	Médecine générale
PONT	Médecine générale
SAUTOT	Chirurgie générale
TRAEGER	Médecine générale
VIGNON	Médecine générale
BONAMOUR	Ophtalmologie
COLIN	Médecine légale
de MOURGUES Georges	Chirurgie générale
DEVIC	Médecine générale
DUMONT Martial	Obstétrique
DURAND	Urologie
FRANCILLON	Chirurgie générale
SAUBIER	Chirurgie générale
SCHOTT	Neuro-psychiatrie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie
CHASSARD	Electro-radiologie
FAYSSE	Orthopédie
GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie

MM. GARDE	Médecine générale
HUGONNIER	Ophtalmologie
KALB	Pneumo-phtisiologie
LARBRE	Médecine générale
MARET	Chirurgie générale
MORNEX	Médecine générale
NORMAND	Médecine générale
PERRIN André	Médecine générale
BETHENOD	Pédiatrie et puériculture
DUMAS	Stomatologie
GARMIER	Obstétrique
NOEL	Médecine générale
SCHNEPP	Orthopédie

Examineurs de la Thèse

MM. le Professeur M. CHAMBON, Président
L. ROCHE
L. PERROT
J. GRAS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553204_0022

A MES PARENTS

Dont la vie toute de travail
et de dévouement a toujours été
pour moi le meilleur des exem-
ples.

Faible témoignage de mon
profond attachement.

A MA FEMME

Qui me prodigua son appui
affectueux pendant mes études et à
tout moment de la vie.

A MES FRERES

A MES SOEURS

Avec toute mon affection.

A MES BEAUX-PARENTS

Par leur compréhension
et leur affection, ils ont su
faciliter mon séjour en France.

Je les en remercie avec
émotion.

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur M. CHAMBON

Professeur de Chimie Organique et de Toxicologie

Officier de la Légion d'Honneur

Pour la bienveillance qu'il nous a témoignée en nous orientant dans le choix de notre travail, et pour l'aide effective qu'il nous a apportée dans la réalisation de ce travail. Nous le remercions du grand honneur qu'il nous fait en acceptant la présidence de notre jury, et nous le prions de trouver ici l'expression de notre vive et respectueuse reconnaissance pour son précieux enseignement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur L. ROCHE
Professeur de Médecine légale et
Toxicologie médicale
Médecin des Hôpitaux

Qui nous a fait l'honneur de bien vouloir
s'intéresser à nos recherches et d'accepter
de faire partie de notre jury de thèse.
Avec nos remerciements respectueux.

Monsieur le Professeur L. PERROT
Professeur de Chimie
Pharmacien-Chef des Hôpitaux

Nous le prions de trouver ici l'expression de notre reconnaissance pour l'affabilité et la compréhension qu'il nous a toujours témoignées au cours de nos études et de notre travail.

En acceptant d'être notre juge, il nous donne une marque d'estime à laquelle nous sommes très sensible.

Monsieur le Professeur Agrégé J. GRAS

Nous le remercions de son enseignement et de la bienveillance qu'il nous a témoignée en nous faisant l'honneur de juger ce travail.

A NOS MAITRES
DE LA FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

I N T R O D U C T I O N

La morphine est un analgésique puissant bien connu, mais elle est toxique et présente l'inconvénient majeur d'engendrer une toxicomanie. De nombreux auteurs, toxicologues ou pharmacologues, se sont donc préoccupés du problème de sa détection et de son dosage, en utilisant des procédés très divers. De nombreuses méthodes ont été proposées, qui tiennent aux difficultés de l'extraction de la morphine et à ses transformations en cours d'extraction.

Le but de notre travail sera d'étudier séparément les principales méthodes d'extraction de la morphine proposées pour des buts toxicologiques. Chaque extraction sera suivie d'un dosage selon la méthode de L.A. WOODS déjà souvent utilisée, après modification, au Laboratoire de Monsieur le Professeur CHAMBON, et nous confronterons les résultats obtenus.

Nous avons suivi le plan suivant :

Première Partie : Généralités et Travaux Antérieurs

Deuxième Partie : Travaux Personnels
Discussion

Conclusion

Bibliographie

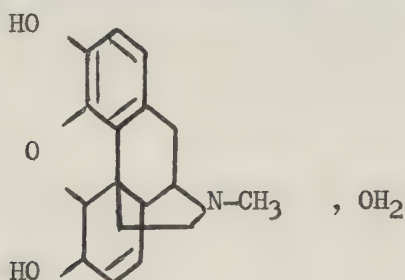
PREMIERE PARTIE

GENERALITES
ET TRAVAUX ANTERIEURS

I - LA MORPHINE

PRINCIPALES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

La morphine, inscrite dans toutes les Pharmacopées, est un alcaloïde à noyau phénanthrénique, dérivé du tétrahydrophénanthrène, du benzofuranne et de la benzoisoquinoléine, dont nous rappelons la formule et les propriétés.

1. Formule de GULLAND-ROBINSON-SCHÖPF :2. Propriétés physico-chimiques (22, 23, 12, 50, 34)

La morphine se présente sous forme de cristaux incolores, brillants, très réfringents, avec une molécule d'eau de cristallisation. La morphine a un poids moléculaire de 303,3. Sa saveur est très amère.

La morphine perd son eau de cristallisation à 110° C, et bout à 230° C.

Elle est lévogyre : $[\alpha]_D = 136^\circ \pm 1^\circ$.

C'est une base tertiaire qui possède une fonction phénol en 3, ce qui conditionne ses principales propriétés chimiques, et une fonction alcool II en 6. Sa solution alcoolique bleuit le tournesol.

Solubilité dans :

- pyridine	6 parties
- aniline	16 "
- Alcool absolu à 25° C.	40 "
- ammoniacque	93 "
- acétate d'éthyle à 18 - 22° C.	537 "
- alcool amylique	1135 "
- benzène	1600 "
- glycérine	2222 "
- chloroforme	2500 "
- eau à 80° C.	3333 "
- eau à 18° C.	3353 "

La morphine est peu soluble dans l'eau et dans l'éther, qui ne pourront donc pas être utilisés comme solvants d'extraction de l'alcaloïde-base. Après précipitation de l'un de ses sels par un alcali, la morphine devient plus soluble dans l'éther éthylique. D'autre part, la morphine, peu soluble dans le chloroforme pur, devient soluble dans un mélange de chloroforme et d'alcool éthylique.

Avec les acides, la morphine donne des sels cristallisables, solubles dans l'eau, et en particulier un chlorhydrate (sel le plus employé). Les solutions aqueuses de ces sels précipitent avec les bases alcalines et alcalino-terreuses, telles que les hydroxydes de sodium, potassium ou calcium, mais ces précipités sont solubles dans un excès de base, avec formation de mor-

phicates alcalins. Pour extraire la morphine à partir d'une solution aqueuse, il faudra donc utiliser de préférence un agent alcalin faible - un carbonate acide de sodium ou de potassium, par exemple -. On peut la séparer d'une solution alcaline par addition d'un sel d'ammonium ou par une neutralisation préalable par un acide dilué, suivie d'une addition de NH_4OH jusqu'à alcalinisation.
(5)

La présence de la fonction phénol libre explique la solubilité de la morphine dans les bases alcalines et alcalino-terreuses en solution aqueuse, et même dans l'eau de chaux, ainsi que son oxydabilité en oxydimorphine. La molécule présente aussi une fonction amine interne tertiaire avec possibilité de transformation en aminoxyde (57) qui donne avec l'acide chlorhydrique un sel bien cristallisé. Elle renferme également une fonction alcool II qui peut être oxydée en cétone (= morphinone). La fonction phénol en 3, mais aussi la fonction alcool II en 6 peuvent être estérifiées, propriété qu'utilise WOODS dans sa méthode de dosage.

II -- PRINCIPALES METHODES PROPOSEES

POUR L'EXTRACTION DE LA MORPHINE

A PARTIR D'UNE SOLUTION AQUEUSE

La méthode classique d'extraction de la morphine,, celle de STAS-OTTO (60, 61) adaptée par OGIER (50), est basée sur la précipitation de la morphine contenue dans la solution aqueuse extractive par le carbonate acide de sodium ou de potassium, ou par le borate de sodium, avec reprise par l'éther de la morphine ainsi libérée. Mais pour DRAGGENDORFF (18) l'éther ne permet qu'une extraction incomplète, et il propose comme agent de libération de la morphine l'ammoniaque et comme dissolvants le chloroforme et l'alcool amylique que l'on fait agir successivement. FABRE (20, 21), confirme de ne pas utiliser l'éther comme solvant d'extraction, mais de lui préférer l'alcool benzylique.

BAGGESGAARD et ses Collaborateurs (3) ont recommandé un mélange de chloroforme - acétone à volumes égaux ; d'après eux, un litre de ce mélange dissoudrait 7,885 g de morphine, à 18° C.

MARCILLE (36) préconise, comme agents de précipitation, les carbonates acides de sodium ou de potassium et, comme solvant, le chloroforme, qu'il ne fait agir "qu'après avoir légèrement alcoolisé la solution contenant la morphine à extraire".

Dans sa thèse, en 1929, GUYOT (29) reprend le travail de MARCILLE et montre que le carbonate acide de sodium est effectivement un meilleur agent de libération de la morphine que l'ammoniaque. L'auteur confirme également la valeur d'une extraction par le chloroforme, qu'il fait agir sur la solution aqueuse additionnée d'une

quantité suffisante d'alcool pour obtenir un titre de 40 degrés, et alcalinisée par CO_3HNa . Mais, pour les applications toxicologiques, il ne faudra pas dépasser un titre alcoolique de 30 degrés, afin de diminuer la dissolution des impuretés présentes.

Dans sa thèse, GUYOT a fait la critique des méthodes de certains de ses prédécesseurs, et, en particulier, GERARD et ses collaborateurs (27), KAUFFMANN-ASSER (32), DORLENCOURT (17), BALLS et WOLFF (4). Nous ne reviendrons donc pas sur ces méthodes, mais nous mettrons en parallèle l'application de la méthode de GUYOT et celle des différentes autres méthodes d'extraction plus récentes, dont nous rappellerons les principes et les détails d'application.

Nous classerons cet exposé en fonction de la nature des solvants simples ou associés utilisés.

1. CHLOROFORME

a - Méthode de MANNERING et coll. (35)

La solution aqueuse chlorhydrique de morphine est alcalinisée à pH 8,5 par la soude et soumise à une quadruple extraction par des volumes égaux de chloroforme. Les extraits chloroformiques sont évaporés sur un bain de vapeur, et toute la morphine doit se retrouver dans le résidu d'évaporation.

2. CHLOROFORME - ALCOOL ETHYLIQUE

a - Méthode de J.M.F. GUYOT (29)

L'auteur alcalinise la solution acide en lui ajoutant un léger excès de carbonate acide de sodium que l'on élimine en filtrant sur du coton de verre. Il ajoute à ce filtrat une quantité suffisante d'alcool à 95 de-

grés pour obtenir un mélange à 30 degrés (soit 46 ml d'alcool à 95 degrés pour 100 ml de filtrat). Avec l'alcool que l'on doit ainsi ajouter, on lave le coton de verre qui a retenu l'excès de carbonate acide de sodium. On agite pour mélanger, on verse dans une ampoule à décantation, puis on ajoute un certain volume de chloroforme (environ 20 ml de chloroforme pour 50 ml de solution alcoolique alcaline); on agite à nouveau l'ensemble pendant une à deux minutes. Après une demi-heure environ, on recueille dans une capsule en porcelaine le chloroforme séparé, après l'avoir filtré sur papier, pour le déshydrater.

On ajoute dans l'ampoule à décantation une nouvelle quantité de chloroforme, puis on opère comme précédemment en recueillant cependant cette seconde solution dans une nouvelle capsule de porcelaine. On peut même faire une troisième opération analogue si besoin. On évapore ensuite le contenu des deux capsules de porcelaine et, sur chaque résidu, on effectue le dosage.

b - Méthode de M. CHAMBON et P. CHAMBON (10)

C'est une adaptation de la méthode de Guyot, mise au point en vue d'un dosage de la morphine selon la méthode de WOODS.

La solution morphinique est additionnée d'alcool à 95° dans la proportion de 33 volumes pour 73 volumes de solution d'hydrolyse et, par addition très progressive de carbonate acide de sodium pulvérisé, d'abord neutralisée, puis encore additionnée d'un léger excès. Cette liqueur est épuisée avec soin par trois fois 10 à 20 ml de chloroforme purifié. Les extraits chloroformiques réunis et centrifugés sont concentrés par distillation sous pression réduite à environ 5 ml. Cet extrait chloroformique est épuisé à deux reprises par agitation avec, chaque fois, 5 ml de ClH N/2 . Ces solutions chlorhydriques réunies et centrifugées sont débarrassées de la couche organique.

Il est nécessaire de prendre de très grandes précautions pour le choix et la préparation des solvants organiques servant aux extractions (9). Les solvants tels que le chloroforme, le dichloréthane... doivent être lavés, séchés et distillés avant leur emploi, afin qu'ils ne contiennent plus de peroxydes.

c - Méthode de DAUBNEY et NICKOLLS (15, 16)

1,5 à 2 litres de solution sont alcalinisés par l'ammoniaque et on leur ajoute avec précaution 100 à 150 ml d'éthanol, de façon à obtenir une mince couche superficielle. La morphine est extraite avec 5 fois 100 ml d'un mélange de chloroforme (1 vol.)-éthanol (1 vol.). Les extraits sont réunis.

Les auteurs proposent aussi une méthode d'alcalinisation qui vient recouper les conseils de BAMFORD (5) : à la solution morphinique acidulée on ajoute une solution chaude saturée de sulfate d'ammonium contenant 1 pour cent d'acide acétique. L'extraction se fait par un mélange à volumes égaux de chloroforme et d'éthanol. L'extrait organique est agité avec un peu d'eau, pour déplacer les sels d'ammonium, puis avec un peu de soude caustique à 5 pour cent. Les extraits aqueux et alcalins réunis sont acidifiés puis rendus ammoniacaux et extraits avec le mélange chloroforme-éthanol.

d - Méthode d'OBERST (49)

La solution acide de morphine est saturée de carbonate acide de sodium pour libérer l'alcaloïde-base. Ensuite elle est soumise à une triple extraction dans une ampoule à décantation par un mélange éthanol (1 vol.) - chloroforme (3 vol.). Les solvants d'extraction sont réunis, additionnés de 0,3 ml de ClH à 0,5 pour cent, transvasés dans une capsule et évaporés à sec. Le résidu est repris par SO_4H_2 dilué.

3. CHLOROFORME - ISOPROPANOL

a - Méthode de PAERREGAARD (51, 52)

15 ml d'une solution de morphine sont amenés à pH 8-9 par le carbonate acide de sodium, et extraits par 3 fois des volumes égaux du mélange isopropanol (1 vol.) - chloroforme (3 vol.). Les solvants réunis sont évaporés à sec et le résidu est repris par le méthanol.

b - Méthode de TOMPSETT

L'auteur s'est intéressé d'une part, à l'extraction des phénols (66) et des aminophénols (65, 67, 68) dans les liquides biologiques, et d'autre part, à l'extraction des alcaloïdes à partir de ces mêmes milieux biologiques (69, 70) par formation de composés avec des indicateurs. L'auteur passe en revue, au cours de ses travaux, l'extraction de nombreux alcaloïdes, dont la morphine. Celle-ci, bien que possédant une fonction phénol, n'est pas déplacée par l'éther, solvant utilisé pour l'extraction des phénols et aminophénols. L'auteur a même déterminé les systèmes indicateur-solvant capables de réagir avec la morphine en milieu tamponné.

Ce sont, par exemple, les systèmes suivants :

- . benzène - méthylorange;
- . chloroforme - isopropanol - méthylorange;
- . dichloréthane - méthylorange (ce dernier système confirme l'intérêt de la méthode de dosage proposée par M. CHAMBON, d'après L.A. WOODS.)

L'auteur propose sa propre méthode d'extraction : 5 ml de solution acide sont neutralisés par l'addition de carbonate de sodium; le mélange est extrait par 20 ml, puis 2 fois 5 ml du mélange isopropanol (1 vol.) - chloroforme (3 vol.). Les extraits réunis sont déshydratés par filtration sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporés à sec.

Le rendement de cette méthode serait de 96 à 103 %.

c - Méthode de MILTHERS

La méthode originale de l'auteur (39, 40) consistait à alcaliniser à pH 8-9 20 ml d'une liqueur acidulée de morphine par du carbonate acide de sodium; cette alcalinisation était suivie d'une triple extraction par des volumes égaux d'un mélange isopropanol (1 partie) - chloroforme (3 parties). Les extraits organiques étaient réunis, filtrés et séchés sur du sulfate de sodium anhydre, lavé lui-même ensuite avec 2 ml de solvant. Cette déshydratation des extraits était suivie d'une évaporation à sec, après addition de 2 gouttes de ClH N qui a pour but de transformer la base en chlorhydrate de morphine, plus stable et soluble en milieu aqueux. Le résidu d'évaporation était ensuite repris par HCl N . L'auteur obtenait un rendement de $97 \% \pm 5 \%$.

La méthode décrite plus récemment par MILTHERS diffère peu de la précédente (41 - 44) : 5 ml de solution aqueuse sont alcalinisés par 4 g. de carbonate neutre de sodium et soumis ensuite à la triple extraction par des volumes égaux du mélange chloroforme (3 vol.) - isopropanol (1 vol.). Les extraits sont réunis, séchés par filtration sur SO_4Na_2 anhydre, et évaporés à sec comme précédemment. Le rendement obtenu est sensiblement le même.

d - Méthode de T. JOHANNESSON (30, 31)

JOHANNESSON applique intégralement la méthode de MILTHERS, qui est en réalité une adaptation de la méthode de PAERREGAARD, et avec un rendement aussi satisfaisant.

e - Méthode de M. FELDSTEIN et N. KLENSHOJ (23)

La solution morphinique est alcalinisée par l'ammoniaque. Cette alcalinisation est suivie d'une extraction en plusieurs fois par un mélange chloroforme (5 vol.) - isopropanol (1 vol.). L'extrait est filtré, desséché sur SO_4Na_2 anhydre pendant plusieurs heures, et évaporé à sec sur un bain de vapeur.

f - Méthode de CURRY et PHANG (14)

La solution morphinique aqueuse est alcalinisée par addition d'ammoniaque; elle est ensuite agitée avec un mélange chloroforme (5 vol.) - isopropanol (1 vol.); on procède à plusieurs extractions successives. Les extraits organiques réunis sont évaporés à sec et repris par SO_4H_2 0,1 N.

4. CHLOROFORME - ALCOOL AMYLIQUE

a - Méthode de PIERCE et PLANT (55-56)

Les auteurs étudient l'extraction de la morphine à partir de l'urine. 60 ml d'urine sont alcalinisés par saturation avec $\text{CO}_3\text{H Na}$ pulvérisé, et mis dans un extracteur de WOLFF (pour liquide) avec 110 à 125 ml d'un mélange de chloroforme (3 parties) - éthanol à 95 pour 100 (1 partie). L'extraction se fait en maintenant l'ébullition jusqu'à déplacement total de la morphine, ce qui équivaut à une extraction avec 10 volumes de solvant. Le solvant est transvasé dans un évaporateur et on rince les parois de l'appareil avec de petites quantités de HCl à 0,5 pour cent, puis par 2 fois 5 ml. Les extraits acides sont réunis dans une ampoule à décantation, alcalinisés avec du carbonate acide de sodium pulvérisé, à saturation, et agités 3 fois pendant 5 minutes, mécaniquement, avec un mélange chloroforme (2 vol.) - alcool amylique (1 $\frac{1}{2}$ vol.). Les extraits organiques obtenus sont acidifiés par HCl dilué, évaporés. Le résidu est repris par HCl dilué à 5 pour cent.

b - Méthode d'OBERST et LEXINGTON (46-48)

À l'origine, OBERST et LEXINGTON ont suivi la méthode d'extraction de PIERCE et PLANT, en y apportant quelques modifications : d'une part, après la première extraction dans l'extracteur de WOLFF, ils reprennent le résidu par une solution saturée de carbonate acide de sodium et font une deuxième extraction; d'autre part, ils

modifient très légèrement les volumes respectifs des solvants : chloroforme (3 vol.) et alcool amylique (1 vol.).

35 ml de solution sont alcalinisés par CO_3HNa pulvérisé, et extraits par 1,5 à 2 volumes du mélange chloroforme (3 vol.) - alcool amylique (1 vol.), 3 ou 4 fois de suite. Les extraits réunis sont acidulés par ClH dilué, et évaporés à sec. Le résidu est dissous dans ClH dilué, à 0,5 pour cent.

5 - N-BUTANOL

- Méthode de FUJIMOTO (25, 26)

15 ml de solution sont neutralisés et légèrement alcalinisés par l'hydroxyde de potassium dilué; on ajoute 20 ml de n-butanol. Le mélange est agité mécaniquement pendant 5 minutes, puis centrifugé une minute à 2000 tours-minute. Un aliquot de 15 ml de la couche n-butanol est transféré dans un flacon contenant 22 ml de $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$; on soumet à agitation pendant trois minutes et on centrifuge. La couche de n-butanol est éliminée par aspiration. D'après l'auteur, l'extraction est quantitative à partir de 6 μg de morphine par ml de solution d'extraction avec moins de 10 % de pertes.

6 - BENZENE - ALCOOL ISOAMYLIQUE

- Méthode d'AXELROD (2, 6)

1 à 5 ml de solution, d'une concentration d'au moins 0,5 à 3 μg , sont pipetés dans un flacon rôdé de 60 ml renfermant 1 ml de NaOH N et 15 ml de benzène contenant 3 % d'alcool isoamylique destiné à éviter l'adsorption de la drogue à la surface du verre. Le mélange est soumis à une agitation mécanique pendant 10 minutes, puis

centrifugé. La phase benzénique est séparée de la phase aqueuse.

7. BENZENE - n-BUTANOL

a - Méthode de PAERREGAARD (51-54)

15 ml de solution aqueuse de sel de morphine sont amenés à pH 8-9 par addition de carbonate acide de sodium, et extraits trois fois avec 15 ml, 10 ml et 10 ml du mélange benzène (1 vol.) - n-butanol (1 vol.). La phase organique est ensuite agitée avec 15 ml de SO_4H_2 N.

b - Méthode de FELDSTEIN (24)

Après une étude de la solubilité de la morphine à des pH variés et dans différents solvants (chloroforme, acétate d'éthyle, alcool isoamylique, etc...), l'auteur a choisi un pH d'extraction égal à 8,2. C'est en effet à pH 8,2 et en utilisant comme solvant un mélange n-butanol - benzène, que le rendement d'extraction a été le meilleur : 97 pour cent, et cela sans jamais obtenir d'émulsion.

Technique : A 50 ml d'urine, on ajoute 10 ml de solution saturée de carbonate acide de sodium. L'extraction se fait par agitation mécanique, pendant quinze minutes, de l'urine alcalinisée, dans 100 ml d'un mélange n-butanol (1 vol.) - benzène (1 vol.). Après séparation, le solvant est filtré et son volume est mesuré. Il est alors agité avec 10 ml de ClH 0,1 N dans une ampoule à décantation. La couche chlorhydrique est séparée du solvant, et on en pipette 5 ml.

8. DICHLORETHANE - ALCOOL ISOAMYLIQUE

- Méthode d'AXELROD (2)

A 1 à 5 ml d'une solution contenant 3 à 50 μg de principe actif, on ajoute 1 ml de NaOH et 15 ml de

dichloréthane contenant 2 % d'alcool isoamylique, pour éviter l'adsorption de la drogue à la surface du verre. Le flacon est enveloppé d'un torchon et agité mécaniquement pendant 20 minutes. Pour éviter la formation d'une émulsion, on ne doit pas dépasser un rythme d'agitation de 300 tours minute. On centrifuge et on isole la phase organique par aspiration.

9. ACETATE D'ETHYLE

a - Méthode d'OBERST (49)

La solution aqueuse acide est saturée de carbonate acide de sodium, puis soumise à une triple extraction dans une ampoule à décantation par de l'acétate d'éthyle purifié. Les solvants d'extraction sont réunis, additionnés de 0,3 ml de ClH à 0,5 pour cent, transvasés dans une capsule, et évaporés à sec. Le résidu est repris par l'acide sulfurique dilué.

b - Méthode de GROSS et THOMPSON (28, 64)

Les auteurs se sont inspirés de la méthode d'OBERST. La solution morphinique est saturée par du carbonate acide de sodium pulvérisé, puis extraite trois fois avec des volumes égaux d'acétate d'éthyle. Les liqueurs d'extraction sont réunies avec 10 ml de ClH à 0,5 pour cent, et évaporées à sec sur un bain de vapeur.

Le rendement de cette méthode serait de 84 %.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS



I -- DOSAGE DE LA MORPHINE :
 METHODE DE M. CHAMBON ET P. CHAMBON
 ADAPTEE DE L.A. WOODS

Nous avons repris chaque méthode d'extraction décrite ci-dessus, et nous l'avons fait suivre de la même méthode de dosage -- décrite par L.A. WOODS (71-77, 37, 38) et modifiée par M. CHAMBON et P. CHAMBON (10) -- afin d'obtenir des résultats quantitativement comparables.

Principe :

Le produit d'extraction est estérifié et complexé. En effet, la difficulté principale pour la recherche de la morphine dans les milieux biologiques est la faible solubilité de la base, à la fois dans l'eau et dans les solvants organiques. Mais la faible solubilité dans les solvants organiques est compensée par estérification de la morphine par le chlorure de p-nitrobenzoyle. Cet ester est extrait d'une solution aqueuse alcaline par le 1-2 dichloréthane et complexé avec le méthylorange, en vue du dosage colorimétrique ou -- mieux -- spectrophotométrique, selon la méthode de BRODIE (6,7) issue de celle de PRUDHOMME (58).

Réactifs :

- Chloroforme pur, lavé et distillé extemporanément.
- 1 - 2 Dichloréthane lavé, séché, redistillé. E = 83°5.
- Réactif avec chlorure de p-nitrobenzoyle 2 g. dans 100 de dichloréthane; à préparer extemporanément.
- Tampon borate pH 9 : acide borique 4 g, OHNa 15 g., dissous dans H₂O q.s.p. 1 litre.

- Solution acide borique 0,5 M =
acide borique 3,09 g/100 ml.
- Réactif Méthyl-orange : dissoudre à chaud 500 mg de méthyl-orange dans 100 ml d'eau et filtrer à chaud. Agiter trois fois la solution avec des volumes égaux de chloroforme pur, et lavé. Avant usage, diluer 0,5 ml de cette solution-stock avec un volume égal de solution d'acide borique 0,5 M.

Technique : (10, 13, 72, 45)

Verser dans une petite ampoule à décantation 5 ml de la solution chlorhydrique d'extraction, ajouter 1 ml de solution de sulfite acide de sodium à 40 %; neutraliser avec 2 ou 3 gouttes de solution de NaOH à 43 %. Rapidement, ajouter 10 ml de réactif au chlorure de p-nitrobenzoyle à 2 % dans le dichloréthane et 1 ml de solution NaOH à 43 %.

Agiter 40 minutes à la machine à agiter. Passer le mélange dans une ampoule à décantation ou centrifuger et rejeter la couche superficielle aqueuse. Laver la phase organique par agitation avec 5 ml de tampon borate pH 9 pendant 1 minute, et éliminer la phase aqueuse.

Laver encore la phase organique par agitation une minute avec 5 ml de tampon phosphate pH 5, et séparer, toujours quantitativement, la phase organique contenant l'ester p. nitrobenzoïque de la morphine.

La phase organique, placée dans une petite ampoule à décanter, est additionnée de 0,5 ml de solution réactif méthyl-orange et agitée énergiquement pendant 10 minutes.

Séparer parfaitement la phase organique, qui a pu se teinter en orangé, dans un tube à centrifuger, et après agitation éliminer avec soin par agitation toutes traces de la solution aqueuse de méthylorange. Filtrer encore la solution organique du complexe sur un fragment de coton hydrophile desséché, destiné à éliminer complètement toute trace de solution aqueuse.

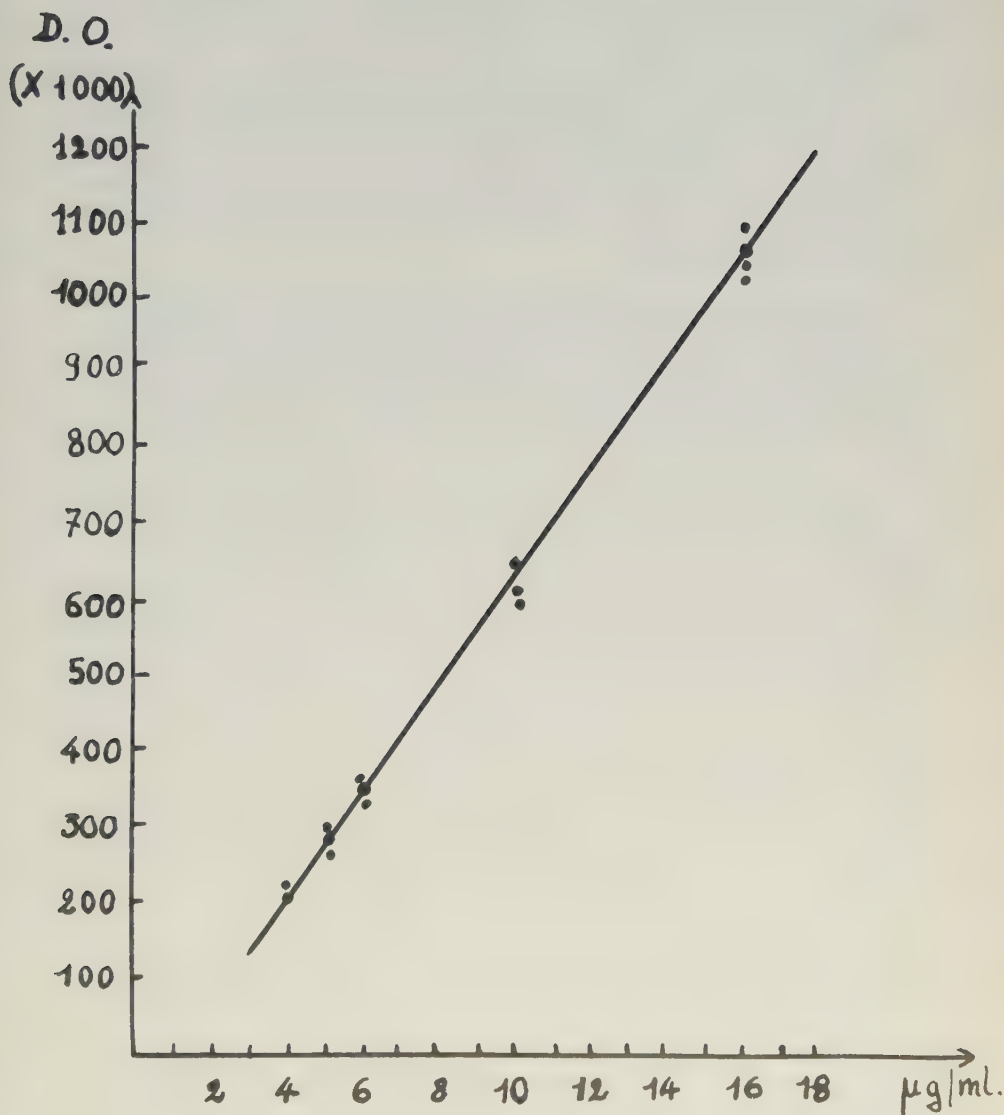
La solution du complexe p-nitrobenzoylmorphine - méthyl-orange dans le dichloréthane, pourra être utilement examinée au spectrophotomètre, et s'il est nécessaire par dilution dans le dichloréthane. Une partie aliquote sera mise en réserve pour chromatographie.

La fraction restante (5 ml) de la solution organique du complexe est versée dans une petite ampoule à décanter et agitée énergiquement, pendant 5 minutes, avec 4 ml de ClH N/I. La solution aqueuse se colore en rouge violacé plus ou moins intense, correspondant à la dissociation du complexe et à la libération du méthylorange. La phase organique retient la majeure partie de l'ester morphinique.

Séparer quantitativement la solution aqueuse colorée de méthylorange. Lire la densité optique à 515 mμ dans une cuve de 1 cm d'épaisseur, au spectrophotomètre électronique JOBIN et YVON.

La multiplicité des opérations décrites entraîne d'inévitables pertes. Il en résulte que, pour obtenir un dosage correct, une courbe étalon des rapports densité-optique des solutions résiduelles de méthylorange / concentration de morphine, doit être établie par points successifs. Les prises d'essai correspondantes, échelonnées entre 3 et 20 microgrammes, subissent toutes les opérations d'extraction, estérification, complexation. Un témoin est effectué, sans morphine, et mesure la qualité des réactifs et des manipulations.

<u>Chlorhydrate de morphine</u> exprimé en microg.ml.	<u>DENSITES OPTIQUES</u> (x 1000)	<u>D.O. MOYENNE</u> (x 1000)
<u>4</u>	205,210,210,198,202,205	<u>205</u>
<u>5</u>	280,270,275,280,288,280	<u>280</u>
<u>6</u>	355,350,343,345,350,350	<u>350</u>
<u>10</u>	580,620,630,625,615,620	<u>620</u>
<u>16</u>	1100,1070,1070,1055,1050, 1070,1060	<u>1070</u>



Courbe d'étalonnage du chlorhydrate de morphine.

Méthode de REDMOND (N.) et PARKER (J.M.) (59)

C'est encore une modification de la méthode de WOODS.

Les auteurs disent obtenir une meilleure formation de complexe avec une concentration différente de méthylorange (0,5 g./litre, au lieu de 5 g./litre), et en utilisant de plus grandes quantités de cette solution (5 ml au lieu de 0,5 ml). De cette façon, la densité optique augmenterait de 20 %.

Nous avons essayé d'appliquer nous-même cette méthode. En réalité nous n'avons pas obtenu l'augmentation de densité optique attendue, mais au contraire une diminution de densité optique, à concentration égale en principe actif.

Nous sommes donc finalement resté fidèle à la méthode de M. CHAMBON et P. CHAMBON, adaptée de celle de WOODS.

II - APPLICATION DES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION RESULTATS OBTENUS

Nous avons suivi aussi scrupuleusement que possible les méthodes d'extraction décrites par les auteurs et précédemment exposées, mais nous avons été amené quelquefois à pallier l'insuffisance des détails techniques donnés par certains auteurs. Par exemple, nous avons mesuré le pH de la solution issue de la technique d'alcalinisation indiquée par quelques auteurs qui ne précisaient pas de pH.

Nous avons classé nos résultats selon la nature des solvants utilisés. Et pendant tous nos travaux, nous avons utilisé une solution mère de chlorhydrate de morphine dans l'eau distillée, à une concentration de $100 \mu \text{ g./ml}$. Cette solution, additionnée d'une petite quantité de ClH dilué, était conservée au réfrigérateur. Quant à la verrerie, suivant les volumes manipulés, nous avons employé des ampoules à décantation de 25 ou 125 ml et des ballons rôtés de 50 ml, de façon à éviter le contact des solutions alcalines avec un trop grand volume d'air.

1. CHLOROFORME

- Méthode de MANNERING et coll. (35)

Nous avons préparé 10 ml de solution par dilution de 5 ml de solution mère à $100 \mu \text{ g/ml}$ dans 5 ml d'eau distillée, que nous avons alcalinisés - selon indication de l'auteur - avec NaOH jusqu'à pH 8,5, vérifié au pH-Mètre

RADIOMETER 22, afin de libérer l'alcaloïde de son sel. Immédiatement après, cette solution fut soumise à 4 extractions par 8 ml de chloroforme purifié. L'auteur n'ayant pas précisé la quantité de solvant nécessaire à l'extraction, nous avons choisi d'utiliser un volume d'environ 30 ml au total.

Les extraits chloroformiques sont concentrés par distillation sous pression réduite jusqu'à 10 ml environ. Afin de pouvoir appliquer alors la méthode de dosage décrite par M. CHAMBON et P. CHAMBON, nous épuisons cet extrait chloroformique à 2 reprises par agitation de 2 minutes avec, chaque fois, 5 ml de ClH N/2. Ces solutions chlorhydriques sont réunies. On en prélève des parties aliquotes correspondant théoriquement à une concentration finale totale de 30 μ g. et 80 μ g., soit 8 μ g et 16 μ g./ml.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml Dosage sur 5 ml - μ g.ml - théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ ml. -	Rendement %
6	75	2,20	36,5
	75	2,20	36,5
	80	2,30	38,2
16	320	5,60	35
	322	5,63	35,2
	324	5,65	35,3

2. CHLOROFORME - ALCOOL ETHYLIQUE

a - Méthode de J.M.F. GUYOT (29)

Nous avons **prélevé** 5 ml de solution mère de chlorhydrate de morphine à 100 ~~g.~~ g./ml, que nous avons dilués dans 5 ml d'eau distillée. L'auteur ne précisant pas le pH à atteindre, nous avons suivi la phase de neutralisation puis d'alcalinisation par saturation avec CO_3HNa grâce à l'indicateur spectral Codex(II) qui vire au bleu-vert. A ce moment-là nous effectuons une mesure du pH sur pH-Mètre RADIOMETER 22, mesure qui correspond aussi à celle de l'Universal-Indikatorpapier Merck : en procédant de cette manière, on trouve un pH 8,1.

Il faut alors ajouter 4,6 ml d'alcool éthylique à 95 degrés pour obtenir une solution alcoolique ayant un titre de 30 degrés (d'après les proportions données par l'auteur : 100 ml de solution + 46 ml d'alcool à 95 degrés). L'extraction est ensuite effectuée avec 10 ml de chloroforme pur en agitant à la main pendant 2 minutes (l'auteur ne précise pas le temps d'agitation). La couche chloroformique inférieure est recueillie par filtration dans une capsule en porcelaine. Il est procédé à une deuxième extraction avec 10 ml de chloroforme purifié. Contrairement à l'auteur, nous devons réunir les extraits en vue du dosage. Après évaporation par distillation sous pression réduite, le résidu est repris par 10 ml d'eau distillée additionnée de 1 % de ClH .

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine			
Extraction sur 10 ml	D.O.	Chlorhydrate	Rendement
Dosage sur	(x 1000)	de morphine	%
5 ml		extrait	
$\mu\text{g./ml}$ - théorique		$\mu\text{g./ml.}$	
6	280	5	83
	285	5,1	84,6
	335	5,8	96,3
	340	5,9	97,94
16	1015	15,25	95,3
	1020	15,40	96,25
	1030	15,40	96,25

b - Méthode de M. CHAMBON et P. CHAMBON (10)

Nous avons dilué 5 ml de solution mère à $100\mu\text{g./ml}$ avec 5 ml d'eau distillée. Ces 10 ml sont mis dans un petit flacon et additionnés d'alcool à 95 degrés dans la proportion de 33 volumes pour 73 volumes de solution d'hydrolyse, c'est-à-dire, pour le cas présent, 4,52 ml d'alcool à 95 degrés pour 10 ml de solution d'hydrolyse. Par adjonction très progressive de CO_2HNa on neutralise puis on ajoute un léger excès. Les auteurs ne précisant pas le pH à atteindre, nous avons mesuré le pH obtenu en opérant de cette manière : le pH est égal

à 8. La liqueur est alors rapidement épuisée avec soin par 3 fois 10 ml de chloroforme purifié, en agitant 2 minutes chaque fois.

Nous avons terminé l'extraction et effectué le dosage exactement comme les auteurs l'ont décrit(10) à partir de fractions aliquotes choisies en conséquence.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml Dosage sur 5 ml - μ g./ml.- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml. -	Rendement %
6	295	5,25	87,15
	298	5,27	87,2
	305	5,35	88
	305	5,35	88
16	1020	15,40	97
	1020	15,40	97

c - Méthode de DAUBNEY et NICKOLLS (15-16)

Nous sommes partis d'une prise d'essai de 30 ml, obtenue en diluant 5 ml de solution mère à 100 μ g/ml dans 25 ml d'eau distillée. En effet, lorsque les auteurs ont décrit leur méthode, ils utilisaient au départ de très grandes quantités de solution (1,5 l. de solution pour 500 ml. de solvant), ce qui nous a

obligé à réduire volontairement la quantité de solution à doser et, parallèlement, le volume de solvant dont nous avons utilisé 10 ml.

Les 30 ml de solution morphinique ont été légèrement alcalinisés par addition d'ammoniaque diluée, goutte à goutte, jusqu'au virage au bleu d'un papier tournesol sensible, ce qui correspondait, par mesure au pH-Mètre RADIOMETER 22 à un pH 8 (car DAUBNEY et NICKOLLS ne précisaient pas le pH à obtenir). L'extraction s'est faite dans une ampoule à décantation, par agitation, avec 2 ml du mélange éthanol (1 vol.) - chloroforme (1 vol.) des auteurs. On fait 5 extractions en agitant 3 minutes pendant les 2 premières, et 2 minutes pendant les suivantes.

Les extraits organiques réunis sont concentrés par distillation sous pression réduite et repris, selon M. CHAMBON et P. CHAMBON, par 2 fois 5 ml de ClH N/2, en agitant 2 minutes chaque fois.

RESULTAT :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 30 ml Dosage sur 5 ml - μ g./ml- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml-	Rendement %
6	22		insignifiant
	35		
	37		
16	36		insignifiant
	42		
	44		

d - Méthode d'OBERST (49)

A partir de 10 ml de solution morphinique obtenus par dilution de 5 ml de solution mère à 100μ g./ml dans 5 ml d'eau distillée, nous avons procédé à l'alcalinisation par saturation avec CO_2HNa . Le pH est vérifié au pH-Mètre RADIOMETER, en vue d'obtenir un pH égal à 8,1.

On fait ensuite une triple extraction avec, chaque fois, 10 ml d'un mélange chloroforme (3 vol.) - éthanol (1 vol.). L'auteur ne donnant pas de précisions à ce sujet, nous agitions à la main pendant 3 minutes au cours des deux premières extractions, et pendant 2 minutes au cours de la troisième.

Les extraits chloroformiques additionnés d'un peu de ClH sont concentrés par distillation sous pression réduite. La solution concentrée obtenue est épuisée par agitation pendant 2 minutes avec 5 ml de ClH N/2, 2 fois de suite.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. - μ g./ml.- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml.-	Rendement %
6	340	5,90	97,95
	350	6	100
	350	6	100
16	1020	15,4	96,25
	1050	15,8	98,7
	1060	15,9	99,3

3. CHLOROFORME - ISOPROPANOL

a - Méthode de PAERREGAARD (52)

15 ml de solution morphinique (volume indiqué par l'auteur) sont préparés par addition de 10 ml d'eau distillée dans 5 ml de solution mère à 100 μ g./ml. L'auteur préconisant une alcalinisation à pH compris entre 8 et 9, par addition progressive d'une solution saturée de CO_3HNa , nous avons choisi un pH intermédiaire de 8,5, vérifié au pH-Mètre RADIOMETER 22.

La solution alcaline est soumise à une triple extraction par chaque fois 10 ml de chloroforme (3 vol.) - isopropanol (1 vol.). Les 2 premières agitations durent 3 minutes, la troisième 2 minutes (l'auteur ne donne aucune précision à ce sujet). Les extraits sont concentrés par distillation sous pression réduite et épuisés 2 fois par 5 ml de $\text{ClH N}/2$.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 15 ml. Dosage sur 5 ml. -- μ g./ml.-- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait -- μ g./ml.--	Rendement %
6	56		Insignifiant
	63		
	65		
16	355	6,1	38,12
	358	6,15	38,4
	362	6,2	38,75

b - Méthode de TOMPSETT (70)

Selon l'auteur, il faut neutraliser par addition de CO_3HNa ; on suit donc au pH-mètre RADIOMETER 22 la neutralisation à pH 7 des 10 ml de solution morphinique préparés selon la technique habituelle (5 ml de solution mère à 100μ g./ml et 5 ml d'eau distillée). A pH 7, l'indicateur spectral est jaune-vert.

Ensuite les 3 extractions se font avec 20 ml, puis 5 ml et 5 ml du mélange chloroforme (3 vol.) - isopropanol (1 vol.), en agitant 3 minutes pour les deux premières extractions et 2 minutes pour la dernière.

Les extraits organiques obtenus sont réunis, desséchés par filtration sur sulfate de sodium anhydre, concentrés par distillation sous pression réduite, épuisés par 2 fois 5 ml de ClH N/2 .

Remarque : Après filtration des extraits sur SO_4Na_2 anhydre, on ajoute un peu de solvant neuf sur le filtre, afin d'entraîner le solvant d'extraction qui a pu être retenu par le sulfate.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. - μ g./ml.- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml.-	Rendement %
6	36 34 60 64		Insignifiant
16	640 644 650	10,1 10,16 10,2	63,1 63,7 63,75

c - Méthode de MILTHERS (41-44)

10 ml de solution contenant 500 microgrammes de chlorhydrate de morphine sont alcalinisés par 4 grammes de CO_3Na_2 , 10 H_2O (Codex) car l'auteur ne précise pas le type de molécule de carbonate neutre de sodium à utiliser. L'indicateur spectral vire au violet; au pH Mètre, nous avons noté un pH égal à 10,9.

La solution est soumise à une triple extraction par, chaque fois, 10 ml d'un mélange chloroforme-isopropanol (3-1), l'auteur ne précisant pas la quantité de solvant à employer.

Après filtration sur SO_4Na_2 anhydre, nous ajoutons un peu de solvant neuf sur le filtre, afin d'entraîner celui qui a pu être retenu par le sulfate. Ensuite, on concentre par distillation sous pression réduite et on reprend par 2 fois 5 ml de $\text{ClH N}/2$

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. - $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ - théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ -	Rendement %
6	75		Insignifiant
	77		
	85		
	87		
16	300	5,3	31,12
	330	5,75	35,90
	515	8,30	51,9
	540	8,65	54

d - Méthode de FELDSTEIN et KLENDSHOF (23)

10 ml de solution renfermant 500 μ g de chlorhydrate de morphine sont alcalinisés par addition de NH_4OH ; l'auteur ne précisant pas le pH à obtenir, nous avons alcalinisé jusqu'à obtention d'un pH 8, vérifié par le virage au bleu d'un papier de tournesol sensible et au pH Mètre.

L'alcalinisation est suivie d'une triple extraction par chaque fois 10 ml du mélange chloroforme - isopropanol (5-1) sur SO_4Na_2 anhydre pendant 1 heure, puis filtrés et concentrés par distillation sous pression réduite. On épuise ensuite par 2 fois 5 ml de $\text{ClH N}/2$.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. - μ g./ml.- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml.-	Rendement %
6	72 72 73 75		Insignifiant
16	420 425 440 460	6,95 7,1 7,25 7,5	43,7 44,3 45,3 46,6

e - Méthode de CUREY et PHANG (14)

Cette méthode se rapproche beaucoup de celle de FELDSTEIN, puisqu'elle utilise le même alcalinisant, NH_4OH , et un mélange chloroforme-isopropanol (5-1). Seule différence, les extraits organiques ne sont pas déshydratés avant leur concentration. D'autre part, les auteurs parlant de plusieurs extractions, nous en avons fait quatre, c'est-à-dire une de plus que dans la méthode de FELDSTEIN.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. - $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ - théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ -	Rendement %
6	105	2,60	43,2
	107	2,65	43,9
	112	2,75	45,6
	115	2,80	46,5
16	485	7,80	48,75
	502	8,10	50,6
	515	8,25	51,6
	542	8,60	53,75

4. CHLOROFORME - ALCOOL AMYLIQUE

a - Méthode de PIERCE et PLANT (55-56)

10 ml de solution contenant 500 μ g de chlorhydrate de morphine sont alcalinisés, selon l'auteur, par CO_3HNa pulvérisé ajouté à saturation. On observe ainsi un pH 8,1 mesuré au pH Mètre.

La solution alcaline est extraite par 3 fois 10 ml d'un mélange chloroforme - alcool amylique (2-1,5), en agitant chaque fois pendant 5 minutes, mécaniquement (le temps d'agitation est celui que préconise l'auteur). Après concentration des extraits réunis par distillation sous pression réduite, on procède à l'épuisement par 2 fois 5 ml de $\text{ClH N}/2$.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine			
Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. - μ g./ml.- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml.-	Rendement %
6	295	5,25	87,15
	312	5,52	91,6
	325	5,70	94,6
	350	6	100
16	990	14,85	94,8
	1020	15,40	96,25
	1035	15,50	96,9
	1071	16,02	100,1

5. n-BUTANOL- Méthode de FUJIMOTO (25)

A 10 ml de solution à 500 μ g de chlorhydrate de morphine, obtenue en diluant 5 ml de solution à 100 μ g/ml dans 5 ml d'eau distillée, on ajoute KOH diluée et, l'auteur ne précisant pas le pH à atteindre, nous le fixons à pH 8.

L'extraction se fait alors, selon les indications de l'auteur, par 15 ml de butanol, par agitation mécanique pendant 5 minutes. Il se forme une émulsion que l'on détruit par centrifugation d'une minute à 2000 tours/minute.

On procède ensuite, selon la méthode habituelle, à une extraction par ClH N/2.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml - μ g./ml.- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml.-	Rendement %
6	270	4,9	81,3
	272	4,95	82,1
	275	5	83
	275	5	83
16	790	12,15	75,9
	795	12,20	76,3
	800	12,30	76,87
	800	12,30	76,87

6. BENZENE -- ALCOOL ISOAMYLIQUEa -- Méthode d'AXELROD (2)

Nous ajoutons, selon les proportions indiquées par l'auteur, 5 ml de solution de chlorhydrate de morphine à 100 μ g./ml dans un petit flacon rodé contenant 1 ml de NaOH N et 15 ml de benzène purifié contenant 3 % d'alcool isoamylique. On soumet le mélange à une agitation mécanique de 10 minutes, suivie d'une centrifugation à petite vitesse pour casser la faible émulsion qui se produit. On recueille la couche supérieure qui est alors soumise à une concentration puis une double extraction par ClH N/2, selon la technique que nous avons adoptée.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 5 ml. Dosage sur 5 ml. - μ g./ml.- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml.-	Rendement %
6	0	0	0
16	0	0	0

b - Méthode d'OBERST et LEXINGTON (46)

10 ml de solution contenant 500 μ g de chlorhydrate de morphine sont alcalinisés par addition de CO_2HNa pulvérisé, sans saturation (d'après l'auteur). On note alors un pH égal à 8.

La solution est extraite par 3 fois 16 ml du mélange chloroforme - alcool amylique (3-1), c'est-à-dire par chaque fois 1,6 volume de la solution d'extraction (l'auteur parlant d'employer, en solvant, 1,5 à 2 fois le volume de la solution à extraire). Les deux premières agitations se font pendant 3 minutes, la troisième pendant 2 minutes, suivant les conditions de standardisation que nous avons adoptées.

Après concentration par distillation sous pression réduite, on reprend l'extrait obtenu par 2 fois 5 ml de $\text{ClH N}/2$.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. - μ g./ml.- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml.-	Rendement %
6	214	4,15	68,9
	217	4,17	69,2
	220	4,20	69,7
	220	4,20	69,7
16	1050	15,80	98,75
	1055	15,82	98,8
	1062	15,9	99,3
	1070	16	100

7. n-BUTANOL - BENZENEa - Méthode de PAERREGAARD (52)

A 15 ml d'une solution à 500 μ g. de chlorhydrate de morphine, on ajoute une solution saturée de CO_3HNa , par conséquent carbonatée, jusqu'à obtention d'un pH 8,5, vérifié au pH Mètre (l'auteur parlant d'un pH compris entre 8 et 9, nous avons choisi un pH exactement intermédiaire : 8,5).

On procède à 3 extractions par 15 ml., puis 10 ml et 10 ml du mélange n-butanol-benzène purifié (1-1). Les extraits réunis sont concentrés et épuisés par ClH N/2 selon notre technique habituelle.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 15 ml. Dosage sur 5 ml. -- μ g./ml.-- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait -- μ g./ml.--	Rendement %
6	105	2,60	43,2
	107	2,63	43,6
	110	2,70	44,8
16	410	6,75	42,2
	415	6,80	42,5
	455	7,50	46,9

b -- Méthode de FELDSTEIN (24)

Avec une solution saturée de CO_2HNa , on amène 10 ml de solution renfermant 500 μg . de chlorhydrate de morphine à un pH égal à 8,2 (précisé par l'auteur), vérifié avec l'indicateur spectral qui est bleu-vert et au pH Mètre RADIOMETER 22.

On soumet cette solution alcaline à une seule extraction avec 20 ml de n-butanol-benzène (1-1) par agitation mécanique pendant 15 minutes. La couche organique est filtrée, concentrée et épuisée par $\text{ClH N}/2$.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml -- $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ -- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait -- $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ --	Rendement %
6	298	5,28	87,2
	305	5,42	89,9
	326	5,7	94,5
	340	5,75	97,95
16	960	14,40	90
	984	14,75	92,1
	1005	15,10	94,3
	1025	15,45	96,5

8. DICHLORETHANE - ALCOOL ISOAMYLIQUE

- Méthode d'AXELROD (2)

Nous ajoutons, en suivant les proportions données par l'auteur, 5 ml de solution de chlorhydrate de morphine à 100 μ g./ml. dans un petit flacon rodé contenant 1 ml de NaOH N et 15 ml de dichloréthane à 2 % d'alcool isoamylique. On soumet le mélange à une agitation mécanique de 20 minutes, suivie d'une centrifugation à petite vitesse pour casser la faible émulsion qui se produit. On recueille la couche inférieure qui est alors soumise à une concentration et à une double extraction par ClH N/2.

RESULTATS

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 5 ml. Dosage sur 5 ml. - μ g./ml. - théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml. -	Rendement %
6	0	0	0
16	0	0	0

9. ACETATE D'ETHYLEa - Méthode d'OBERST (49)

On ajoute CO_2HNa pulvérisé, jusqu'à saturation (selon l'auteur), à 10 ml de solution de chlorhydrate de morphine contenant 500 μg . de principe actif. On obtient ainsi un pH 8,1. On soumet cette solution à une extraction par 3 fois 10 ml d'acétate d'éthyle purifié, en agitant trois minutes les 2 premières fois, et deux minutes la troisième fois. On ajoute 0,3 ml de ClH avant de concentrer par distillation sous pression réduite, et on reprend par ClH N/2.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. -- μg ./ml.-- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait -- μg ./ml.--	Rendement %
6	235	4,35	72,2
	250	4,70	78
	264	5,15	85,4
	330	5,75	95,45
16	800	12,25	76,5
	836	12,80	80
	865	13,20	82,5
	980	14,75	92,20

b - Méthode de GROSS et THOMPSON (28)

On opère exactement selon la méthode d'OBERST, mais en concentrant directement les extraits obtenus, sans acidification préalable.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. --µg./ml.-- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait --µg./ml.--	Rendement %
6	230	4,30	71,30
	232	4,45	73,80
	245	4,60	76,30
	255	4,70	78,05
16	850	13	81,25
	854	13,10	81,87
	862	13,20	82,10
	870	13,25	82,80

10. ESSAIS PERSONNELSa - Acétone - chloroforme

A 10 ml de solution contenant 500 μ g de chlorhydrate de morphine, nous avons ajouté CO_3HNa pulvérisé jusqu'à saturation, c'est-à-dire à pH 8,1. Ensuite, nous avons fait une triple extraction par, chaque fois, 10 ml d'acétone-chloroforme (1-1), en agitant 3 minutes les deux premières fois, puis deux minutes seulement.

Cette extraction est suivie d'une concentration par distillation sous vide des liquides organiques qui sont alors épuisés par 2 fois 5 ml de ClH N/2 , en agitant 2 minutes chaque fois.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. - μ g./ml. - théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml. -	Rendement %
6	270	4,95	81,18
	280	5,05	83,83
	285	5,15	85,5
16	655	10,25	64,10
	668	10,45	65,30
	680	10,60	66,25

b - Méthode de MILTHERS modifiée

10 ml de solution de chlorhydrate de morphine sont alcalinisés par addition de CO_3Na_2 , 10 H_2O , jusqu'à pH 8,1. Cette solution est alors soumise à une triple extraction par, chaque fois, 10 ml d'un mélange chloroforme isopropanol (3=1). Après filtration sur SO_4Na_2 anhydre, l'extrait organique est soumis à concentration et est épuisé par 2 fois 5 ml de $\text{ClH N}/2$.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml Dosage sur 5 ml. -µg./ml.- théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait -µg./ml.-	Rendement %
6	212	4,10	68
	255	4,70	78,05
	302	5,40	89,6
	325	5,70	94,6
16	750	11,60	72,3
	780	12	75
	790	12,20	76,25
	800	12,25	76,60

c - Méthode de DAUBNEY et NICKOLLS modifiée

Nous avons inversé le rapport solution à extraire/solvant d'extraction. L'auteur opérait en effet selon le rapport 3 : 1 alors que nous avons préféré utiliser le rapport 1 : 3.

10 ml. de solution renfermant 500 μ g de chlorhydrate de morphine sont amenés à pH 8 par NH_4OH et soumis à trois extractions successives par 10 ml d'un mélange éthanol - chloroforme purifié (1-1) en agitant 3 minutes les 2 premières fois et 2 minutes la troisième fois.

RESULTATS :

Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. - μ g./ml. - théorique	D.O. (x 1000)	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml. -	Rendement %
6	285	5,15	85,50
	295	5,30	87,90
	300	5,35	88,80
	320	5,60	92,95
16	940	14,25	89
	948	14,35	89,6
	955	14,40	90
	960	14,50	90,6

TABLEAU RECAPITULATIF
DES RESULTATS OBTENUS

(Lorsque l'auteur n'indique pas
le pH à obtenir, nous notons
entre parenthèses celui que nous
avons observé après alcalinisa-
tion.)

METHODES	Alcalinisant prescrit pH observé	Solvants d'extraction Rapport Solution/ solvant	Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. — mg./ml. — théorique	D.O. (x 1000) Valeurs extrêmes observées	Chlorhydrate de morphine extrait — mg./ml. —	Rendement % extrêmes
MANNERING (35)	NaOH pH 8,5	Chloroforme —— 1 : 3	6 16	75 80 320 324	2,20 2,30 5,60 5,65	36,50 38,20 35 35,30
GUYOT (29)	CO ₃ HNa à saturation (pH = 8,1)	Ethanol q.s.p. 30° + Chloroforme —— 1 : 2,5	6 16	280 340 1015 1020	5 5,90 15,25 15,40	83 97,95 95,30 96,25
M. CHAMBON et P. CHAMBON (10)	CO ₃ HNa (pH 8)	Ethanol q.s.p. 30° + Chloroforme —— 1 : 3,5	6 16	295 305 1020 1020	5,25 5,35 15,40 15,40	87,15 88 96,25 96,25

DAUBNEY et NICKOLLS (15)	NH OH 4 (pH 8)	Ethanol(1v.) + Chloroforme _____ (1v.) 3 : 1	6 16	22 37 36 44	Insigni- fiant "
OBERST (49)	CO ₃ HNa à saturation (pH 8,1)	Ethanol(1v.) + Chloroforme _____ (3v.) 1 : 3	6 16	340 350 1020 1060 5,90 6 15,40 15,90	97,95 100 96,25 99,30
PAERREGAARD (52)	CO ₃ HNa (pH 8,5)	Isopropanol + (1 v.) Chloroforme _____ (3v.) 1,5 : 3	6 16	56 65 355 362	Insigni- fiant 38,10 38,75
TOMPSETT (70)	CO ₃ HNa (pH 7)	Isopropanol + (1v.) Chloroforme _____ (3v.) 1 : 3	6 16	36 64 640 650 10,10 10,20	Insigni- fiant 63,10 63,75

METHODES	Alcalinisant prescrit pH observé	Solvants d'extraction Rapport Solution/ solvant	Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. - μ g./ml.- théorique	D.O. (x 1000) valeurs extrêmes observées	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml.-	Rendement % extrêmes
MILTHERS (41)	CO_3Na_2 (pH 10,9)	Isopropanol (1 v.) + Chloroforme (3 v.) 1 : 3	6 16	75 87 300 540	 5,30 8,65	Insigni- fiant 33,12 54
FELDSTEIN (23)	NH_4OH (pH 8)	Isopropanol (1 v.) + Chloroforme (3 v.) 1 : 3	6 16	72 420 460	 6,95 7,50	Insigni- fiant 43,70 46,60
CURRY et PHANG (14)	NH_4OH (pH 8)	Isopropanol (1 v.) + Chloroforme (5 v.) 1 : 3	6 16	105 115 485 542	2,60 2,80 7,80 8,60	43,20 46,50 48,75 53,75

PIERCE et PLANT (55)	CO ₃ HNa à saturation (pH 8,1)	Alcool Amylique (1,5v.) + Chloroforme (2 v.) <u>1 : 3</u>	6 16	295 350 990 1071	5,25 6 14,85 16,00	87,15 100 94,80 100,10
OBERST et LEXINGTON (46)	CO ₃ HNa (pH 8)	Alcool Amylique (1 v.) + Chloroforme (3 v.) <u>1 : 2</u>	6 16	214 220 1050 1070	4,15 4,20 15,80 16	68,90 69,70 98,75 100
FUJIMOTO (25)	KOH (pH 8)	n-Butanol <u>1 : 1,5</u>	6 16	270 275 790 800	4,90 4,95 12,15 12,30	81,30 82,20 75,90 76,80
AXELROD (2)	NaOH N/I (pH 12,85)	Benzène + Alcool isoamylique (3 %) <u>1 : 3</u>	6 16	0 0	0 0	0 0
FELDSTEIN (24)	CO ₃ HNa (pH 8,2)	n-Butanol (1 v.) + Benzène(1v.) <u>1 : 2</u>	6 16	298 340 960 1025	5,28 5,75 14,40 15,45	87,20 97,95 90 96,50

METHODES	Alcalinisant prescrit pH observé	Solvants d'extraction Rapport Solution/ solvant	Chlorhydrate de morphine Extraction sur 10 ml. Dosage sur 5 ml. - μ g./ml. - théorique	D.O. (x 1000) valeurs extrêmes observées	Chlorhydrate de morphine extrait - μ g./ml. -	Rendement % extrêmes
PAERREGAARD (52)	CO_3HNa (pH 8,5)	n-Butanol (1 v.) + Benzène (1 v.) 1 : 2	6 16	105 110 410 455	2,60 2,70 6,75 7,50	43,20 44,80 42,20 46,90
AXELROD (2)	NaOH N/I (pH 12,85)	Dichloré- thane + Alcool iso- amylique (2 %) 1 : 3	6 16	0 0	0 0	0 0
OBERST (49)	CO_3HNa (pH 8,1)	Acétate d' éthyle 1 : 3	6 16	235 330 800 980	4,35 5,75 12,25 14,75	72,20 95,45 76,50 92,20

GROSS et THOMPSON (28)	CO_3HNa à saturation (pH 8,1)	Acétate d'éthyle 1 : 3	6 16	230 255 850 870	4,30 4,70 13 13,25	71,30 78,05 81,25 82,80
ESSAI PERSONNEL	CO_3HNa à saturation pH 8,1	Acétone (1 v.) + Chloroforme (1 v.) 1 : 3	6 16	270 285 655 680	4,95 5,15 10,25 10,60	81,18 85,50 64,10 66,25
Modification personnelle de la méthode DAUBNEY et NICKOLLS	NH_4OH pH 8	Ethanol (1 v.) + Chloroforme (1 v.) 1 : 3	6 16	285 320 940 960	5,15 5,60 14,25 14,50	85,50 92,95 89 90,60
Modification personnelle de la méthode de MILTHERS	CO_3Na_2 , 10 H_2O pH 8,1	Isopropanol (1 v.) + Chloroforme (3v.) 1 : 3	6 16	212 325 750 800	4,10 5,70 11,60 12,25	68 94,60 72,30 76,60

DISCUSSION

Le but de notre travail était une confrontation des différentes méthodes d'extraction de la morphine proposées dans la littérature moderne. Ainsi que nous l'avons déjà dit, il nous est arrivé de pallier l'insuffisante précision des publications, et dans ce cas nous l'avons indiqué dans notre rédaction.

La confrontation des résultats assez hétérogènes ainsi obtenus nous invite à ordonner une discussion, afin de mettre en évidence les raisons de l'insuffisance d'extraction ou au contraire signaler les méthodes qui paraissent donner pleine satisfaction et, par conséquent, susceptibles d'être sélectionnées pour l'analyse toxicologique.

Nous pensons choisir, comme base de discussion, l'influence du pH, le choix de la substance alcalinisante, puis le solvant indiqué et éventuellement le rapport volume de solution à extraire/volume de solvant. Nous avons standardisé le temps de contact et le mode d'agitation adoptés lorsque l'auteur n'avait pas précisé ces conditions.

Par ailleurs, tous nos dosages étant faits selon la même méthode, nous pensons que celle-ci ne peut pas être mise en cause dans l'interprétation des résultats.

1. INFLUENCE DU pH D'EXTRACTION

En général tous les auteurs ont travaillé à des pH faiblement alcalins, afin de pouvoir déplacer la morphine de son chlorhydrate mais sans atteindre la formation d'un morphinate alcalin.

Cependant, TOMPSETT (70) demande une simple neutralisation, ce qui semble indiquer un pH 7. Or, à pH 7, la morphine ne doit pas encore être libérée de son sel, ce que confirment les médiocres résultats du dosage.

Inversement, AXELROD (2) qui ajoute NaOH N/1 à sa solution acide atteint obligatoirement un pH trop élevé. En effet, en partant de 10 ml d'une solution à pH 2, par addition de 1 ml de NaOH N/1 (ce que préconise l'auteur) nous avons obtenu un pH très alcalin : 12,85. A ce pH, la morphine a été vraisemblablement altérée avec formation de morphinate de Na, insoluble en milieu organique. C'est pour cette raison que l'extraction a été nulle, bien que l'auteur ait utilisé, dans un cas le benzène avec 3 % d'alcool isoamylique, et dans l'autre le dichloréthane à 2 % d'alcool isoamylique.

Un autre auteur, MILTHERS, conseille d'ajouter 4 grammes de CO_3Na_2 à 5 ml d'une solution morphinique (dont il ne précise pas le pH au départ). Personnellement, par addition de 4 grammes de CO_3Na_2 à 5 ml de notre solution mère de chlorhydrate de morphine ayant un pH 2, nous avons observé un pH final bien supérieur à 9,4, puisqu'il atteignait 10,9. Ce pH est trop élevé et l'extraction est à peu près nulle pour de faibles concentrations de morphine à extraire, et très insuffisante pour des concentrations supérieures.

A part les quelques exceptions notées ci-dessus les méthodes que nous avons appliquées demandaient toutes des pH compris entre 8 et 9. PAERREGAARD préconisait d'atteindre un pH situé entre 8 et 9; nous avons choisi la solution intermédiaire d'un pH 8,5, ce qui nous a permis de comparer ses méthodes à celle de MANNERING qui demande également un pH égal à 8,5. Ces procédés donnent des rendements d'extraction très comparables entre eux et insuffisants, malgré l'utilisation de solvants différents.

Il nous semble donc après cette première étude que le pH d'extraction de la morphine, à partir d'une solution aqueuse de chlorhydrate, doit être compris entre 8 et 8,2. En effet, les méthodes de certains auteurs per-

mettent d'obtenir de très bons résultats comme celles, par exemple, de M. et P. CHAMBON, à pH 8, GUYOT, OBERST, PIERCE et PLANT, à pH 8,1, FELDSTEIN, enfin, à pH 8,2.

Si d'autres méthodes donnent de moins bons résultats à ces mêmes pH, cela doit donc être dû à des facteurs différents : agent d'alcalinisation ou solvant d'extraction, dont nous allons maintenant essayer d'étudier l'influence.

2. INFLUENCE DE L'AGENT D'ALCALINISATION

Pour mieux juger la valeur d'un agent alcalinisant il faut pouvoir comparer les rendements obtenus avec lui et un autre agent alcalinisant, en utilisant le même solvant d'extraction, pour un même pH, voisin de 8.

L'utilisation de CO_3Na_2 en excès est à éviter, comme le prouvent les résultats obtenus par MILTHERS. Cependant, si on diminue la quantité de CO_3Na_2 utilisé, afin de n'obtenir qu'une légère alcalinisation, nos résultats se trouvent améliorés.

La valeur de NH_4OH comme agent d'alcalinisation pose également un problème. Dans sa thèse, GUYOT a comparé l'action de l'ammoniaque et du carbonate acide de sodium : il conclut que l'ammoniaque conduit à des résultats à peu près nuls. Effectivement, pour la méthode de DAUBNEY et NICKOLLS, nous avons obtenu une extraction insignifiante. Mais ce résultat semble être dû en réalité à l'utilisation d'une quantité insuffisante de solvant. En effet, en inversant le rapport solution/solvant éthanol-chloroforme, c'est-à-dire en le faisant passer de 3 : 1 à 1 : 3, nous avons beaucoup amélioré l'extraction finale (85 - 92,95%).

Mais lorsqu'on utilise l'ammoniaque avant une extraction par un mélange chloroforme-isopropanol, les résultats sont à peine moyens. Cela semble dû en partie à l'utilisation de l'ammoniaque comme alcalinisant, car on ne peut pas mettre totalement en cause le choix du solvant qui nous a donné, d'autre part, en modifiant la méthode de MILTHERS, des rendements allant de 68 à 96,6 %.

En présence d'ammoniaque, à pH 8, le rôle du solvant paraît donc beaucoup plus déterminant au cours de l'extraction que pour d'autres alcalinisants, les résultats étant meilleurs avec un mélange éthanol-chloroforme qu'avec le mélange isopropanol-chloroforme.

Cependant nous devons reconnaître que c'est l'alcalinisation par CO_3HNa qui a donné les meilleurs résultats, et cela, avec des solvants variés.

En résumé, nous dirons donc que le pH d'alcalinisation semble plus important en général que la nature de l'alcalinisant lui-même, à condition évidemment de ne pas employer une base trop forte et concentrée, le pH devant rester compris entre 8 et 8,2.

Le carbonate acide de sodium paraît l'alcalinisant de sécurité car, même à saturation, il ne dépasse guère un pH de 8,1 - 8,2, tandis que les autres bases fortes, KOH ou NaOH, et même NH_4OH , risquent de donner des pH beaucoup trop élevés si leur utilisation n'est pas contrôlée au pH Mètre.

3. INFLUENCE DE LA NATURE DU SOLVANT D'EXTRACTION ET DU RAPPORT SOLUTION A EXTRAIRE/SOLVANT

Considérons dès lors les méthodes qui ont utilisé des solvants différents, mais pour des solutions aux pH corrects compris entre 8 et 8,2.

Les solvants utilisés seuls pour l'extraction de la morphine ne donnent pas en général les meilleurs résultats.

L'acétate d'éthyle semble être le meilleur solvant parmi ceux qui ont été utilisés purs. C'est ainsi que OBERST, GROSS et THOMPSON, obtiennent des rendements comparables et assez reproductibles. Cependant les résultats restent insuffisants. On peut faire la même remarque pour l'utilisation du n-butanol selon FUJIMOTO.

Le benzène a fait l'objet d'assez peu d'utilisation et nous ne retiendrons que la méthode de FELDSTEIN (24) à pH 8,2 dans laquelle le benzène est associé au n-butanol, avec un volume de solvant double de celui de la solution à épuiser, et qui conduit à des extractions assez satisfaisantes (87,2 - 97,95 %).

Dans les mêmes conditions valables de pH le chloroforme semble avoir été le plus fréquemment utilisé, associé à des alcools, plus exceptionnellement avec l'acétone. Cet essai personnel n'a d'ailleurs pas donné satisfaction et ce mélange doit être éliminé.

Nous avons étudié ces solvants dans leur ordre de miscibilité à l'eau.

a) - L'utilisation du mélange alcool amylique-chloroforme a été faite par PIERCE et PLANT d'une part, et OBERST et LEXINGTON d'autre part, mais dans des proportions différentes. Les premiers utilisant un mélange alcool amylique-chloroforme (1,5 - 2) pour un rapport solution/solvant égal à 1 : 3. Les seconds préconisent un mélange alcool amylique-chloroforme (1 - 3) pour un rapport solution-solvant égal à 1 : 2.

A de fortes concentrations, nous avons obtenu des résultats assez voisins et très bons. A une concentration plus faible (6 μ g./ml. par exemple) on obtient pour la méthode de PIERCE et PLANT une bien meilleure extraction que pour celle d'OBERST et LEXINGTON, sans doute à cause du plus fort volume de solvant utilisé par rapport à la solution aqueuse à extraire. Il est probable que le pH légèrement supérieur (pH 8,1 ou lieu de pH 8) n'entre pas en jeu puisqu'à de plus fortes concentrations les résultats ne sont pas perturbés.

b) - En appliquant le procédé de MILTHERS, mais à condition d'alcaliniser seulement la solution à pH 8 par CO_3Na_2 , nous avons personnellement obtenu avec le mélange isopropanol-chloroforme (1 - 3) des rendements très améliorés compris

entre 68 et 94,6 % sans être encore très satisfaisants, ce qui paraît alors en relation avec le solvant. Or, c'est la seule méthode avec laquelle nous ayons pu obtenir des résultats à peu près satisfaisants pour le mélange iso-propanol-chloroforme (1-3 ou 1-5).

Ne retenant dans cette utilisation que les méthodes à un pH variable, 8 environ, nous constatons que les rendements sont insuffisants avec ce mélange, qu'il s'agisse de la méthode de CURRY et PHANG ou celle de FELDSTEIN, ou même la nôtre inspirée de celle de MILTHERS avec rectification du pH.

c) - Nous arrivons enfin à l'étude de l'association éthanol-chloroforme qui, dans l'ensemble, donne les résultats les plus constants si l'on opère à un pH compris entre 8 et 8,2.

J. GUYOT et M. CHAMBON utilisent de l'alcool éthylique dilué à 30 degrés dans la solution à extraire. GUYOT, de cette façon, ne recueillait que 80 % environ de la morphine qu'il devait extraire. Peut-être grâce à la méthode de dosage que nous avons adoptée, ou bien grâce à la standardisation des méthodes, nous avons obtenu un rendement amélioré qui atteint 96,25 % pour la méthode de M. et P. CHAMBON et 97,95 % pour celle de GUYOT. Mais il est à noter que la méthode de M. et P. CHAMBON paraît donner des résultats plus groupés et plus réguliers parce que l'alcalinisation n'est effectuée qu'après addition de la quantité suffisante d'éthanol pour obtenir une solution de 30 degrés alcooliques. Les auteurs suivent un rapport solution/solvant égal à 1 : 2,5 ou 1 : 3,5.

Les meilleurs résultats sont obtenus par OBERST, avec un mélange éthanol-chloroforme (1 - 3) et en respectant un rapport solution/solvant égal à 1 : 3. En opérant selon les indications fournies par l'auteur nous avons obtenu les rendements suivants :

6~~00~~ g./ml. : 97,95 % - 100 %
16~~00~~ g./ml. : 96,25 % - 99,3 %

Dans leurs méthodes, GUYOT et CHAMBON, d'une part, et OBERST, d'autre part, utilisent des proportions différentes d'éthanol. En effet, GUYOT et CHAMBON emploient 9 ml environ d'éthanol pour 40 ou 60 ml de solvant, alors qu'OBERST en utilise 15 ml pour 45 ml. Enfin, GUYOT et CHAMBON utilisent l'éthanol en une seule fois, en début d'opération. Cet alcool arrive à s'épuiser au fur et à mesure de l'extraction par CHCl_3 , et doit disparaître presque totalement à la troisième extraction. Dans la méthode d'OBERST on doit insister sur l'apport continu d'alcool à chaque extraction, celui-ci portant toutefois la solution à un degré alcoolique moindre à l'origine, car il est égal à environ 16 degrés.

Mais il est intéressant de noter encore qu'une quantité sensiblement plus forte d'alcool, telle que nous l'avons notée dans la modification que nous avons apportée à la méthode de DAUBNEY et NICKOLLS, ne paraît pas bénéfique.

D'autre part, la méthode de DAUBNEY et NICKOLLS originale, et modifiée par nous, montre très significativement l'importance de la relation solution à épuiser/solvant. Alors que dans la méthode initiale, malgré la multiplication des épuisements à proportion constante, la relation est de 3 de solution à 1 de solvant, les rendements sont insignifiants; le degré d'alcool de la solution extrêmement faible, de l'ordre de 3 ou 4 degrés, et la quantité de chloroforme est également très réduite, assurant surtout un enrichissement de la solution aqueuse en chloroforme qui retient lui-même la base morphine.

Au contraire, notre modification inversant les proportions solution/solvant, traduit une extraction dans un milieu plus riche en alcool (27 à 28 degrés), et renouvelée trois fois. Il apparaît que, si l'on confronte cette modification personnelle que nous avons apportée à la méthode de DAUBNEY et, par ailleurs, la méthode de GUYOT, les résultats dans cette dernière étaient quelque peu meilleurs, ce que l'on peut interpréter par une moindre rétention du chloroforme et de la base qu'il a dissoute dans une liqueur terminale moins alcoolique.

En définitive, il apparaît que, des différentes formules d'extraction envisagées, sont à retenir la méthode de GUYOT et celle de M. et P. CHAMBON et, peut-être, un peu plus favorable encore, celle d'OBERST, qui comporte une alcalinisation par le bicarbonate de sodium en présence d'un mélange solution à épuiser et chloroforme - éthanol (3 - 1) et un épuisement renouvelé 3 fois par des volumes égaux du mélange éthanol-chloroforme.

CONCLUSIONS

Notre but était de comparer les différentes méthodes d'extraction de la morphine, à partir d'une solution aqueuse de ses sels, qu'une abondante bibliographie moderne permet de confronter.

De nos nombreuses expériences de dosage, standardisées quant à la concentration en morphine, au temps d'agitation, à la technique de dosage - celle de M. et P. CHAMBON, adaptée de WOODS - il résulte que nous pouvons aboutir aux conclusions suivantes :

1°. Une extraction valable de la base morphine ne paraît être obtenue par un solvant non miscible que pour des pH compris entre 8 et 8,2.

2°. La technique la plus commode et la plus sûre pour porter la solution aqueuse aux pH 8,1 - 8,2 consiste à utiliser le carbonate acide de sodium dont un excès ne saurait gêner les opérations ultérieures. Il apparaît que l'emploi des alcalis forts, et même de l'ammoniaque, ne saurait être possible qu'avec une mesure précise du pH, sachant que malgré cela NH_4OH peut entraîner une petite rétention de l'alcaloïde.

3°. Parmi les divers solvants utilisés une discrimination peut être faite, d'après les rendements en base extraite au pH optimum 8,1.

a) Ainsi l'acétate d'éthyle (OBERST) est à peu près le seul solvant pur utilisé, et conduit à des résultats acceptables lorsque le rapport solution/solvant est 1 : 3.

b) Le n-butanol (FUJIMOTO) est un solvant qui paraît un peu inférieur à l'acétate d'éthyle.

c) FELDSTEIN, en utilisant le benzène associé au n-butanol, à volumes égaux, dans le rapport solution/solvant 1 : 2, améliore quelque peu les résultats précédents.

d) Le chloroforme, très généralement associé à des alcools totalement ou partiellement solubles dans l'eau, a permis des rendements assez variables.

= Le mélange chloroforme-alcool amylique (2 - 1,5) de PIERCE et PLANT se révèle préférable à celui d'OBERST et LEXINGTON, chloroforme-alcool amylique (3-1), et donne des résultats satisfaisants.

= L'association chloroforme-isopropanol conduit en général à des résultats insuffisants (FELDSTEIN, CURRY et PHANG).

= Divers mélanges chloroforme-éthanol qui rappellent, dans une certaine mesure, les indications du CODEX ont été proposés. Il apparaît que, pour un même solvant et dans des conditions identiques de pH, le rendement peut s'accroître en élevant le rapport solvant/solution, ainsi que nous avons pu le montrer en inversant les proportions initialement prévues par DAUBNEY et NICKOLLS. On peut mettre sur un même plan la formule de GUYOT et son adaptation par M. et P. CHAMBON d'une part, et celle d'OBERST avec chloroforme-éthanol (3-1) d'autre part. La proportion un peu plus élevée d'alcool dans cette dernière technique risque cependant de conduire, dans un mélange plus complexe, à l'extraction d'une base moins pure.

Il nous semble en définitive que les meilleurs résultats d'extraction de la morphine base peuvent être obtenus après alcalinisation par CO_3HNa pulvérisé à saturation et par l'emploi d'un mélange éthanol-chloroforme (1-3) avec des épuisements renouvelés assurant un rapport solvant/solution égal à 3.

Le Président de la Thèse :
Pr: CHAMBON

Vu, le Doyen :
J.F. CIER

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 15 Juin 1964
Le Recteur, Président du Conseil de
l'Université : P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

B I B L I O G R A P H I E

1. ADLER (T.K.), FUJIMOTO (J.M.), WAY (E.L.) and BAKER (E.M.) : The metabolism fate of codeine in man. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1955, (114), 251-261.
2. AXELROD (J.) : Estimation of basic organic compounds with methyl-orange. STEWART (C.) and STOLMAN (A.) : *Toxicology. Mechanisms and Analytical Methods.* Academic Press. 1960; p. 720.
3. BAGGESGAARD and al. : *Dansk Tidsskr. f. Pharm.* 1928, p. 9.
4. BALLS and WOLFF : The determination of morphine. *J. Biol. Chem.* 1928, 379-402.
5. BAMFORD (F.) - Poisons. Their isolation and identification. Churchill. London. 1940, 163-169.
6. BRODIE (B.B.) and UNDEFRIEND (S). : The estimation of basic organic compounds and a technique for the appraisal of specificity. *J. Biol. Chem.* 1945, (158), 705-714.
7. BRODIE (B.B.) and al.. : The estimation of basic organic compounds in biological material. *J. Biol. Chem.*, 1947 (168), 335-344.
8. BRODIE (B.B.) and AXELROD (J.) : The estimation of acetanilide and its metabolic products, aniline, N-acetyl p.aminophenol and p. aminophenol in biological fluids and tissues. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1948, 94, 22-28.

9. CHAMBON (M.) : Considérations sur l'altération de certains alcaloïdes au cours de leur extraction par des solvants organiques riches en peroxydes. IXe Congrès des Sociétés de Pharmacies de France. Clermont-Ferrand, Juin 1957.
10. CHAMBON (M.) et CHAMBON (P.) : Considération sur de nouvelles méthodes de recherches de la morphine au cours d'une expertise toxicologique. Annales de Médecine Légale, 1961, (41), 35-43.
11. CODEX 1937. Colorant B.R.P. Tome I, p. 372.
12. CODEX 1949. pp. 497-8.
13. CRETIN (H.) : Etude du métabolisme et de l'élimination de l'hydromorphone (Dilaudid) et de la dihydronone (Eukodal). Thèse Univ. Lyon. Pharm. 1964.
14. CURRY (A.S.) and PHANG (S.E.) : New apparatus : a continuous extractor for use in toxicological analysis. J. Pharm. and Pharmacol. 1960, (12), 437-441.
15. DAUBNEY (C.G.) and NICKOLLS (L.C.) : An investigation into the methods of toxicological analysis of viscera. I. The Analyst, 1937, (62), 851-859.
16. DAUBNEY (C.G.) and NICKOLLS (L.C.) : An investigation into the methods of toxicological analysis of viscera. II. The Analyst, 1938, (63), 560-566.
17. DORLENCOURT : Contribution à l'étude des processus de défense de l'organisme. Thèse Méd. Paris. 1912.
18. DRAGGENDORF : Manuel de toxicologie. Paris 1866. 157, 333.
19. EL DARAWY (Z.L.) and TOMPSETT (S.L.) : The determination of alkaloids in biological material by compound formation with indicators. The Analyst. 1956, (81), 601-606.
20. FABRE (M.R.) : De quelques solvants intéressants d'alcaloïdes réputés peu solubles. Journ. de Pharm. de Bordeaux. 1924. p. 71.

21. FABRE (M.R.) : Le sort de la morphine dans l'organisme. Journ. de pharm. et de chim., 1924, (30), 183-7.
22. FABRE (R.) et TRUHAUT (R.) : Précis de toxicologie. Tome II, 1961, 415.
23. FELDSTEIN (M.) and KLENDSHOJ (N.C.) : The analysis of "general unknowns" in toxicology. The Analyst, 1953, (78), 43-47.
24. FELDSTEIN (M.) and KLENDSHOJ (N.C.) : (Méthode spectrophotométrique rapide pour le dosage de la morphine dans l'urine). J. Forens. Sc., 1956, (I), 47-56.
25. FUJIMOTO (J.M.) and al.. : A rapid method for the estimation of morphine. J. Lab. Clin. Med. 1954, (44), 627-635.
26. FUJIMOTO (J.M.) and WAY (L.E.). : Isolation and crystallization of "bound" morphine from urine of human addicts. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 1957, (121), 340-346.
27. GERARD, DELEARDE et RICQUET : Journal de Pharmacie et de Chimie, 1905, (22), 49.
28. GROSS (E.G.) and THOMPSON (V.) : The excretion of a combined form of morphine in tolerant and non tolerant dogs. J. Pharmacol. Exptl. Ther. 1940, (68), 413-418.
29. GUYOT (J.M.F.) : Contribution à l'étude toxicologique de la morphine. Doct. Univ. Bordeaux, Pharm. 1929.
30. JOHANNESSON (T.) and MILTHERS (K.) : Morphine and Nor-morphine in the brain of rats. A comparison of subcutaneous intraperitoneal and intravenous administration. Acta pharmacol. et toxicol. 1962, (19), 241-246.

31. JOHANNESSON (T.) : The concentration of morphine in the brains of rats receiving morphine and neostigmine. *Acta pharmacol. et toxicol.* 1962, (19), 286-292.
32. KAUFFMANN-ASSER : *Biochem. Zeitschr.* 1913, (54), 161-173.
33. KOHN-ABREST : *Précis de toxicologie.* 1955, 388-389.
34. LEBEAU (P.) et COURTOIS (G.) : *Traité de Pharmacie Chimique.* 1947, Tome IV, 3791-3800.
35. MANNERING (G.J.), DIXON (A.C.) and al.. : The "in vivo" liberation of morphine from codeine in man. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1954, III, 142-146.
36. MARCILLE : Observations sur la séparation des alcaloïdes et spécialement de la morphine des extraits de viscères. *Annales de Chimie Analytique.* 15 Mai 1927.
37. MELLETT (L.B.) and WOODS (L.A.) : Comparison of the distribution, urinary and fecal elimination of morphine in non-tolerant and tolerant monkeys. *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 1955, (113), 38.
38. (MELLETT (L.B.) and WOODS (L.A.) : The distribution and fate of morphine in the non-tolerant and tolerant monkeys. *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 1956, (116), 77-83.
39. MILTHERS (K.) : Polarographic determination of small amounts of morphine in blood and plasma. *Acta pharmacol. et toxicol.*, 1958, (15), 21-28.
40. MILTHERS (K.) : Polarographic determination of small amounts of morphine in tissues. *Acta pharmacol. et toxicol.* 1959 (16), 10-12.

41. MILTHERS (K.) : Nor-morphine, nalorphine and morphine : quantitative separation and determination of small amounts in blood and tissues. *Acta Pharmacol. et toxicol.*, 1961, (18), 199-206.
42. MILTHERS (K.) : The N-demethylation of morphine in rats. Quantitative determination of nor-morphine and morphine in the urine and feces of rats given subcutaneous morphine. *Acta pharmacol. et toxicol.*, 1962, (19), 149-155.
43. MILTHERS (K.) : The in vivo transformation of morphine and nalorphine into nor-morphine in the brain of rats. *Acta pharmacol. et toxicol.*, 1962, (19), 235-240.
44. MILTHERS (K.) : N-dealkylation of morphine and nalorphine in the brain of rats. *Nature*, 1962, (195), 607.
45. MOUSSALEM (E.) : Etude du métabolisme et de l'élimination du Dextrorphan (d-hydroxy-3-N-méthylmorphinan) énantiomorphe du lévorphane (Dromoran). Thèse Univ. Lyon, Pharm., 1964.
46. OBERST (F.W.) and LEXINGTON (M.S.) : The determination of morphine in the urine. *J. Lab. Clin. Med.*, 1938-9, (24), 318-19.
47. OBERST (F.W.) : Free and bound morphine in the urine of morphine addicts. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1940, (69), 240-251.
48. OBERST (F.W.) : Relationship of the chemical structure of morphine derivatives to their urinary excretion. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1941, (73), 401-404.

49. OBERST (F.W.) : Studies on the fate of morphine, J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1942, (74), 37-41.
50. OGIER (J.) et KOHN-ABREST (E.) : Traité de chimie toxicologique. Tome II, 1924, 224-236.
51. PAERREGAARD (P.) : A new method for quantitative determination of small amounts of morphine in human urine. Acta pharmacol. et toxicol., 1957, (14), 38-52.
52. PAERREGAARD (P.) : Excretion of morphine in the urine of non addicts. Acta pharmacol. et toxicol., 1957, (14), 53-57.
53. PAERREGAARD (P.) and POULSEN (E.) : Excretion of morphine in the urine of non tolerant dogs. Acta pharmacol. et toxicol., 1958, (14), 390-393.
54. PAERREGAARD (P.) : The liberation of morphine from codeine in man and dog. Acta pharmacol. et toxicol., 1958, (14), 394-399.
55. PIERCE and PLANT : Excretion of morphine in tolerant and non-tolerant animals. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 1932, (46), 208-228.
56. PLANT and PIERCE : Recovery of morphine from the tissues of tolerant and non-tolerant animals. J. Pharmacol. Exptl. Therap. (49), 432-449.
57. POLONOVSKI (M.) et POLONOVSKI (M.) : Sur les aminoxydes des alcaloïdes. Bull. Soc. Chim. France, 1926 (39 II), 1147-66.
58. PRUDHOMME (M.R.) Nouvelle méthode colorimétrique de dosage de la quinine dans les liquides biologiques et les organes. J. Pharm. et Chim. 1940 (I, 9^e série) 8-17.
59. REDMOND (N.) and PARKER (J.M.) : Metabolism of codeine : urinary excretion rate of codeine and morphine. Can.J. Biochem. Physiol., 1963 (41), 243-5.

60. STAS : *Annal. d. Chem. u. Pharm.* (84), 379
61. STAS und OTTO : *Annal. d. Chem. u. Pharm.* (100), 44.
62. STEWART (C.P.) and STOLMAN (A.) : *Toxicology. Mechanisms and analytical methods.* T.I, 1960. Academic Press.
63. STOLMAN (A.) and STEWART (C.P.) : Isolation and determination of morphine, codeine and heroine from viscera and body fluids by adsorption. *The Analyst* 1949, (74), 536-542.
64. THOMPSON (V.) and GROSS (E.G.) : Excretion of combined morphine in the tolerant and non-tolerant dog. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 1941, (72), 138-145.
65. TOMPSETT (S.L.) : A study of the identification and determination of phenols and phenolic acids in urine. *Clin. Chim. Acta*, 1958, (3), 149-159.
66. TOMPSETT (S.L.) : The determination in urine of some metabolites... and reference to the presence of aminophenol in urine. *Clin. Chim. Acta*, 1959, (4), 411-419.
67. TOMPSETT (S.L.) : *Clin. Chim. Acta*, 1960, (5), 415.
68. TOMPSETT (S.L.) : The determination of aminophenols and aminobenzoicacids. A study of extraction procedures applicable to biological material. *Anal. Chem. Acta*, 1959, (21), 555.
69. TOMPSETT (S.L.) : The separation of alkaloids from extracts of animal tissues; the use of cation exchange resins. *Acta pharmacol. et toxicol.*, 1960, (17), 295.
70. TOMPSETT (S.L.) : The separation of alkaloids from extracts of animal tissues; the use of cation exchange resins. *Acta pharmacol. et toxicol.*, 1961, (18), 414-418.

71. WOODS (L.A.) : The estimation of amines in biological materials and critical data for cocaine and mescaline. J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1951, (101), 188-199.
 72. WOODS (L.A.) : Estimation of morphine in biological materials. J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1954, (111), 64-73.
 73. WOODS (L.A.) : Distribution and fate of morphine in non-tolerant and tolerant dogs and rats. J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1954, (112), 158-175.
 74. WOODS (L.A.) et coll. : Plasma levels and excretion of codeine and metabolite in the dog and monkey. J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1956, (117), 116-125.
 75. WOODS (L.A.) : Comparative distribution of morphine and nalorphine in dog brain. Fed. Proc., 1956, (15), 502.
 76. WOODS (L.A.) and MUEHLENBECK (H.E.) : Distribution and fate of nalorphine in the dog and rat. J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1957, (120), 52-57.
 77. WOODS (L.A.) : Comparative distribution of morphine and nalorphine in dog brain. J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1957, 120, 58-62.
-

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES ET TRAVAUX PERSONNELS	3
I. LA MORPHINE : Principales propriétés physico-chimiques	5
II. PRINCIPALES METHODES PROPOSEES pour l'extraction de la morphine à partir d'une solution aqueuse	9
1. Chloroforme	10
2. Chloroforme - Alcool éthylique	10
3. Chloroforme - Isopropanol	13
4. Chloroforme - Alcool amylique	15
5. n-Butanol	16
6. Benzène - Alcool isoamylique	16
7. n-Butanol - Benzène	17
8. Dichloréthane - alcool isoamylique	18
9. Acétate d'éthyle	18
DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS	19
I. Dosage de la morphine : Méthode de M.CHAMBON et P. CHAMBON adaptée de L.A. WOODS	21

II. Application de différentes méthodes	
d'extraction - Résultats obtenus.....	27
1. Chloroforme.....	27
2. Chloroforme - Alcool éthylique	29
3. Chloroforme - Isopropanol.....	34
4. Chloroforme - Alcool amylique.....	39
5. n-Butanol	40
6. Benzène - alcool isoamylique	41
7. n-Butanol - Benzène	43
8. Dichloréthane - Alcool isoamylique	45
9. Acétate d'éthyle	46
10. Essais personnels	48
III - TABLEAU RECAPITULATIF DES RESULTATS OBTENUS	51
IV . DISCUSSION.....	59
CONCLUSIONS.....	67
BIBLIOGRAPHIE	69
